Mode d'emploi

Famille de Kits *AllSet*$^{+}$™ et *CombiSet*$^{+}$™ SSP, par Dynal

IVD

CE 0088

MODE D'EMPLOI
Kits ***AllSet*™ et *CombiSet*™** SSP, par DYNAL

TABLE DES MATIERES

Page

USAGE PREVU…… 3

RESUME ET EXPLICATION…… 3

PRINCIPE DU TEST …… 3

REACTIFS…… 4
Matériel fourni dans le kit de typage…… 4
Conditions de conservation…… 4

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS …… 5

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI PAR DYNAL …… 5

MODE OPERATOIRE…… 6
Prélèvement et préparation des échantillons…… 6
Préparation pour la PCR …… 6
Amplification en chaîne par polymérase (PCR)…… 8
Détection par PCR en utilisant l'électrophorèse sur gel d'agarose…… 9

LIMITES DU TEST…… 10

VALEURS THEORIQUES…… 10
Contrôle de la qualité…… 10
Etalon interne…… 10
Interprétation des résultats…… 11
Interprétation en utilisant le *SSPTool*™ de Dynal…… 11

TABLEAU DIAGNOSTIQUEUR DES ANOMALIES/SOLUTIONS …… 12

BIBLIOGRAPHIE…… 13

GARANTIE …… 14

MARQUES DE FABRIQUE UTILISEES DANS CE DOCUMENT/PRODUIT …… 14

BREVETS UTILISES DANS CE DOCUMENT/PRODUIT…… 14

COORDONNEES POUR CONTACT …… 15

MODE D'EMPLOI
Kits ***AllSet*$^{+}$™ et *CombiSet*$^{+}$™** SSP, par DYNAL

Réservé à l'usage diagnostique *in vitro*

USAGE PREVU

ADN-typage HLA allélique Classe I ou Classe II.

RESOLUTION DU TYPAGE

Kits à faible résolution : les allèles seront résolus au niveau générique, ou au niveau du groupe allélique ; il y aura, en général, concordance avec les spécificités définies sérologiquement.

Kits à haute résolution : également appelés kits de sous-typage, ces kits apportent une haute résolution ou un génotypage allélique.

RESUME ET EXPLICATION

Presque toutes les techniques de typage tissulaire à partir d'ADN utilisent la technique PCR[1] pour amplifier le locus HLA à examiner. Dans la plupart des méthodes de typage tissulaire à partir d'ADN, la technique PCR sert d'étape d'amplification pré-typage visant à accroître la quantité d'ADN cible. Le procédé de typage HLA nécessite ensuite une étape de post-amplification pour faire la distinction entre les divers allèles. Contrairement aux autres méthodes de PCR, la Méthodologie SSP[2,3,4,5] employée par Dynal Biotech Ltd dans les Kits *AllSet*$^{+}$™ et *CombiSet*$^{+}$™ SSP, est en mesure de faire la distinction entre les différents allèles durant le procédé de PCR. Ainsi, le traitement post-amplification se limite à une simple étape de détection par électrophorèse sur gel.

PRINCIPE DU TEST

La méthode SSP de Dynal est une technique faisant appel à la PCR, qui utilise des Amorces Spécifiques de Séquence, ou 'Sequence Specific Primers' (SSP), pour le typage tissulaire à partir d'ADN.

Les produits SSP de Dynal se composent de panels de mélanges d'amorces, chacun de ces mélanges contenant une ou plusieurs paires d'amorces spécifiques – on entend par là des amorces spécifiques d'allèle et/ou de groupes d'allèles - ainsi qu'un couple d'amorces témoin apparié aux séquences non alléliques dans les échantillons. Le couple d'amorces témoin fonctionne comme un étalon PCR interne servant à vérifier si les amplifications en chaîne par polymérase (PCR) sont efficaces.

La méthode SSP de Dynal repose sur le principe qu'une amorce parfaitement appariée sera utilisée avec une plus grande efficacité dans la réaction PCR qu'une amorce ayant un ou plusieurs mauvais appariements à son extrémité 3'. La spécificité du système de typage fait partie de l'étape d'amplification PCR et, de ce fait, le traitement post-amplification des échantillons est réduit au minimum.

L'attribution des allèles se borne tout simplement à déterminer s'il y a eu amplification ou non ; autrement dit, il suffit de visualiser et de détecter l'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose. La technique PCR-SSP offre un haut degré de résolution parce que chaque couple d'amorces identifie deux sites polymorphes *cis*-localisés liés. La méthode est très sensible, spécifique et reproductible.

MODE D'EMPLOI
Kits ***AllSet^{+}™ et CombiSet^{+}™*** SSP, par DYNAL

REACTIFS

Réactifs fournis dans tous les Kits *AllSet^{+}™SSP ou CombiSet^{+}™ SSP de Dynal*

<table>
<tr><th>Article</th><th>Description</th></tr>
<tr><td>1. Plateaux PCR avec mélanges d'amorces SSP pré-aliquotés et déshydratés</td><td>Chaque cupule du plateau PCR contient une solution d'amorces SSP déshydratées contenant des amorces spécifiques d'allèles et/ou de groupe d'allèles, ainsi qu'une paire d'amorces témoin appariée à des séquences non alléliques. Le couple d'amorces témoin amplifie un fragment d'un gène conservé présent dans tous les échantillons.</td></tr>
<tr><td>2. Capuchons PCR</td><td>Capuchons pour sceller les plateaux pour PCR</td></tr>
<tr><td>3. Mélange principal (le nombre de flacons inclus dans le kit dépend du nombre de réactions PCR par test – voir tableau adjacent)</td><td>
<table>
<tr><th>Nbre de réactions PCR par test</th><th>Nbre de flacons de mélange principal inclus dans le kit (chacun contenant 1,8 ml)</th></tr>
<tr><td>1-9</td><td>1</td></tr>
<tr><td>10-20</td><td>2</td></tr>
<tr><td>21-40</td><td>3</td></tr>
<tr><td>41-95</td><td>4</td></tr>
<tr><td>96</td><td>5</td></tr>
</table>
Concentration prête à l'emploi. Le mélange principal a été optimisé pour être utilisé avec l'ADN-polymérase AmpliTaq® (Roche Molecular Systems, Inc.)
Des informations sur la formulation sont disponibles en contactant l'adresse : hla@dynalbiotech.com</td></tr>
<tr><td>4. Mode d'emploi du produit / Notice du produit spécifique de lot</td><td>Mode d'emploi et Notice sur le produit spécifique de lot (en anglais BSPI)</td></tr>
<tr><td>5. Fiche d'interprétation</td><td>Fiche permettant de déterminer quel est l'allèle ou le groupe d'allèles que les mélanges d'amorces respectifs sont en mesure d'identifier</td></tr>
</table>

Conservation

1. Conserver les plateaux pour PCR et le mélange principal entre 2 et 8°C.
2. Ne pas congeler les réactifs.
3. Si conservés comme il est indiqué, ces réactifs et mélanges d'amorces resteront stables jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée dans la notice d'information sur le produit spécifique de lot.

MODE D'EMPLOI

Kits ***AllSet*$^{+}$™ et *CombiSet*$^{+}$™** SSP, par DYNAL

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

1. **Réservé à l'usage diagnostique *in vitro.***
2. Toutes les manipulations avec les produits *AllSet*$^{+}$™ et *CombiSet*$^{+}$™ SSP de Dynal doivent être effectués en accord avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire et avec les directives locales telles que les normes EFI et les directives CPA.
3. **Mise en garde relative au danger de contamination** : manipuler tous les échantillons comme s'ils présentaient un danger de contamination. Toutes les manipulations doivent être effectuées en portant des gants et des vêtements/de l'équipement de protection.
4. **Mise en garde relative au danger de contamination :** utiliser les tubes à capuchon à vis pour préparer les spécimens avant d'éviter qu'il y ait des éclaboussures et, le cas échéant, une contamination.
5. **Mise en garde relative au danger de contamination :** manipuler tous les spécimens comme potentiellement infectieux suivant les procédures de sécurité à suivre en laboratoire, telles que celles détaillées dans « *Biosafety in Microbiological ADN Biomedical Laboratories»*[6] et dans le Document M29-T de la NCCLS (Commission nationale de normes de laboratoire d'analyses médicales)[7]. Bien nettoyer et désinfecter tous les plans de travail avec de l'eau de Javel à 1 % (NaClO). Passer à l'autoclave tout équipement ou matériau étant entré en contact avec des spécimens cliniques avant de les jeter.
6. **Mise en garde relative au danger de contamination :** le bromure d'éthidium utilisé pour colorer l'ADN est un agent potentiellement cancérigène. Toujours porter des gants en nitrile pour manipuler les gels colorés et le bromure d'éthidium.
7. **Avertissement :** porter des lunettes bloquant les rayons UV et ne pas diriger directement le regard vers une source de lumière UV sans protéger les yeux lorsqu'on examine ou prend des photos des gels.
8. **Avertissement :** ne pas utiliser les mêmes pipettes pour les manipulations post-PCR et pré-PCR.
9. **Avertissement : contamination.** Eviter la contamination microbienne des réactifs lors du prélèvement de parties aliquotes dans les flacons de réactifs. Toujours porter des gants pour éviter de contaminer les échantillons. Il est recommandé d'utiliser des pipettes stériles et des embouts de pipette à filtre stériles à jeter. **Ne pas utiliser** des réactifs présentant des signes de turbidité ou de contamination microbienne.
10. **Avertissement relatif à l'élimination :** éliminer les réactifs inutilisés et les déchets conformément à la réglementation nationale/fédérale/étatique/locale.
11. **Fiche technique du produit** (MSDS) : on peut se la procurer à l'adresse email www.tissue-typing.com ou sur demande auprès du bureau régional de Dynal Biotech (voir liste détaillée des adresses pertinentes à la dernière page de cette notice).

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI PAR DYNAL BIOTECH:

1. Appareils de pipetage manuel (par ex. Eppendorf, Gilson)
2. Embouts de pipette à filtre, à jeter, pour articles ci-dessus
3. Agitateur-mélangeur
4. Microcentrifugeuse
5. Support de rangement de microtubes de plateau PCR
6. Système de la PCR Perkin-Elmer GeneAmp® 9600 ou 9700, ou tout autre thermalcycler de spécification analogue
7. Plaque chauffante / micro-ondes pour réchauffer les solutions d'agarose
8. Appareil pour électrophorèse (par ex. ABgene Electro-Fast® *Stretch* 108 Complete, AB-0708)
9. Transilluminateur UV
10. Système à gel de documentation photographique/par images
11. Polymérase Taq recombinante (Dynal recommande AmpliTaq®)
12. Agarose pour électrophorèse
13. Bromure d'éthidium

MODE D'EMPLOI
Kits ***AllSet*$^{+}$™ et *CombiSet*$^{+}$™** SSP, par DYNAL
MODE OPERATOIRE

REMARQUE : cette procédure doit se dérouler dans deux zones différentes du laboratoire (Amplification pré-PCR et Amplification post-PCR), comme l'indiquent les instructions suivantes.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Attention : manipuler tous les spécimens comme des produits potentiellement infectieux.

a) IL EST RECOMMANDE DE NE PAS UTILISER DU SANG HEPARINE[8].

b) L'ADN peut être extrait de cellules nucléées humaines, par la méthode que l'on préfère, quelle qu'elle soit.

c) Pour obtenir une amplification PCR-SSP et des résultats de typage optimaux, utiliser de l'ADN ultra-pur (DO 260:280 rapport 1,6-1,8).

d) La concentration finale de l'ADN avant la PCR-SSP doit être de l'ordre de 50 ng/µl.

e) Diluer l'ADN extrait dans de l'eau (H_20).

f) On peut conserver l'ADN à -20˚C ou à une température plus froide pendant des périodes prolongées (> 1 an) sans qu'il ne se produise d'effet indésirable. L'ADN conservé à +4˚ pendant de longues périodes se dégradera, d'où un plus grand nombre d'artéfacts, par exemple des amplifications non spécifiques.

PREPARATION POUR L'AMPLIFICATION PCR (effectuée dans la zone pour pré-PCR)

Pour effectuer un simple typage, préparer le mélange PCR suivant. Consulter le tableau ci-dessous pour connaître les volumes requis (en fonction du nombre de réactions PCR par test).

- Mélange principal
- ADN échantillon (à 50 ng/µl)
- ADN-polymérase AmpliTaq® (à 5 u.i./µl **)**

- Bien mélanger
- Placer 10 µl du mélange PCR ci-dessus dans chaque cupule du plateau du Kit *AllSet*$^{+}$™ ou *CombiSet*$^{+}$™ SSP de Dynal
- Mettre les capuchons PCR en place et bien les visser pour s'assurer que les tubes sont entièrement scellés. On peut se servir d'un outil d'operculage. On peut aussi utiliser des feuilles adhésives compatibles avec la PCR. Les échantillons sont alors prêts pour l'amplification PCR
- Conserver le reste des réactifs du kit à 2-8˚C

MODE D'EMPLOI
Kits ***AllSet*$^{+}$™ et *CombiSet*$^{+}$™** SSP, par DYNAL

Tableau des volumes calculés pour les mélanges PCR :

Nombre de réactions PCR par test	Solution MP (µl)	ADN échantillon (µl)	AmpliTaq® (µl)
1	32	7,6	0,32
4	48	11,4	0,48
6	64	15,2	0,64
8	80	19,0	0,80
10	96	22,8	0,96
12	112	26,6	1,12
14	128	30,4	1,28
16	144	34,2	1,44
18	160	38,0	1,60
20	176	41,8	1,76
22	208	49,4	2,08
24	224	53,2	2,24
26	240	57,0	2,40
28	256	60,8	2,56
30	272	64,6	2,72
40	352	83,6	3,52
42	384	91,2	3,84
44	400	95,0	4,00
46	416	98,8	4,16
48	432	102,6	4,32
96	864	206,0	9,00

REMARQUE : pour les nombres impairs de réactions PCR par test non indiqués dans le tableau ci-dessus, se rendre au prochain numéro pair (par exemple, s'il s'agit de 13 réactions PCR par test, regarder les calculs correspondant à 14 réactions PCR par test).

MODE D'EMPLOI
Kits ***AllSet*$^{+}$™ et *CombiSet*$^{+}$™** SSP, par DYNAL

DISPOSITION DU PLATEAU

L'orientation appropriée du plateau est assurée par le mélange d'amorces placé dans la cupule numéro un (qui est aussi identifiée par l'usage d'un colorant bleu), le **numéro de lot** étant imprimé sur le côté.

par ex. HLA-X								
	1	2	3	4	5	6	7	8
	9	10	11	12	13	14	15	16
	17	18	19	20	21	22	23	24
	25	26	27	28	29	30	31	32
	33	34	35	36	37	38	39	40
	41	42	43	44	45	46	47	48

IGNORER TOUS LES AUTRES NUMEROS MOULES DANS LE PLATEAU EN PLASTIQUE, PAR EXEMPLE 1,2,3

PREPARATION POUR L'AMPLIFICATION PCR (effectuée dans la zone pour post-PCR)

1. Placer le plateau *AllSet*$^{+}$™ ou *CombiSet*$^{+}$™ SSP dans le thermalcycler
   Programmer le le thermalcycler en utilisant les paramètres suivants :

Etapes	Température (˚c)	Durée (sec.)	Action
Une étape de dénaturation	96	120	Dénaturation
10 cycles	96 65	15 60	Dénaturation Hybridation Elongation
20 cycles	96 61 72	10 50 30	Dénaturation Hybridation Elongation

2. Pour des informations spécifiques au sujet du thermalcycler se référer au manuel du fabricant.

3. Faire démarrer le programme.
4. Dès que le programme est terminé, retirer les échantillons du thermalcycler.

REMARQUE : ne pas amener de l'ADN amplifié dans la zone pour pré-amplification PCR.

MODE D'EMPLOI
Kits ***AllSet*$^{+}$™ et *CombiSet*$^{+}$™** SSP, par DYNAL

DETECTION PCR EN UTILISANT L'ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

Remarque : il est recommandé d'utiliser le même tampon pour faire le gel ainsi que pour servir de tampon pour analyse ; autrement dit, si vous utilisez du TBE 0,5 dans le gel, utiliser aussi du TBE 0,5 en tant que tampon pour traitement.

1. Préparer un gel à 2 % (p/v) d'agarose (ABgene MultiABgarose, AG-0100c) dans du tampon TBE 0,5.

   a) Faire dissoudre l'agarose (2 g/100 ml 0,5 x tampon TBE) en le faisant bouillir dans un four à micro-ondes jusqu'à ce qu'il soit complètement dissous.
   - Laisser refroidir jusqu'à ce qu'il soit à 60˚C.
   - Ajouter le bromure d'éthidium jusqu'à obtention d'une concentration finale de 0,5 µg/ml de gel

   b) Couler le gel sur 3 à 4 mm d'épaisseur avec des puits de 3 mm de large.
   - Le laisser se solidifier pendant au moins 15 minutes.

2. Transférer le gel d'agarose dans une unité à électrophorèse sur gels submergés.
   Le gel doit être couvert de là 2mm de TBE 0,5x

   - Retirer le peigne avec grand soin

   - Charger tout le produit PCR séquentiellement, directement et minutieusement sur le gel

3. Analyser les gels dans le tampon TBE 0,5.
   Analyser les minigels (un gel de moins de 10 cm entre les électrodes) pendant 10 minutes à 15V/cm et les gels plus larges pendant 15 minutes à 10V/cm.

   Pour calculer la tension, mesurer la distance (en centimètres) entre les ELECTRODES dans la cuve à électrophorèse (la longueur du gel N'A PAS D'IMPORTANCE).

4. Examiner le gel sous illumination UV et documenter sous forme de photographie.

   a) Le même tampon TBE 0,5 peut être utilisé plusieurs fois, mais la performance sera sans doute meilleure avec un tampon frais.

MISE EN GARDE :	Le bromure d'éthidium est un agent mutagène puissant. Porter des gants en nitrile et des lunettes de protection pour manipuler des gels ou des solutions contenant du bromure d'éthidium.

MODE D'EMPLOI
Kits ***AllSet*$^{+}$™ et *CombiSet*$^{+}$™** SSP, par DYNAL

LIMITES DE LA PROCEDURE

1. En raison de la grande sensibiité de la PCR, faire preuve d'une grande vigilance pour préserver la pureté des réactifs du kit ou les mélanges pour amplification. S'assurer que le déroulement des manipulations à effectuer dans le laboratoire se fait d'une manière unidirectionnelle et que l'amplicon PCR ne soit pas amené dans la zone de préparation de la PCR. La pureté des réactifs n'est maintenue qu'en respectant les bonnes pratiques de laboratoire ; de même, la performance du test ne peut être garantie qu'en adhérant rigoureusement aux procédures spécifiées dans la notice.
2. Les Kits *AllSet*$^{+}$™ et *CombiSet*$^{+}$™ de Dynal ont été mis au point en utilisant uniquement des spécimens de sang entier non hépariné ou d'ADN purifié. La performance n'a pas été évaluée avec d'autres spécimens.
3. L'échantillon d'ADN sert de matrice pour le procédé d'amplification PCR ; sa qualité, en ce qui concerne la pureté et la concentration, ne doit pas dépasser les limites indiquées dans cette procédure.
4. N'importe quel thermalcycler breveté peut être utilisé avec ce produit, à condition que les spécifications de l'instrument soient équivalentes à celles d'un Système PCR Perkin-Elmer GeneAmp® 9600 ou 9700.
5. S'assurer que tous les instruments et l'équipement sont étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

VALEURS THEORIQUES

Contrôle de la qualité

Le contrôle de la qualité et la mise à jour des produits pour typage tissulaire à partir d'ADN sont très importants. Il est impératif de tester les oligonucléotides synthétisés extensivement en les comparant à des ADN de lignées cellulaires connues. Les solutions d'amorces doivent être testées par comparaison avec des ADN positifs et des ADN négatifs à haute séquence analogue.

La procédure pour contrôle de la qualité est la suivante :

- Test de la synthèse des amorces par comparaison avec un panel d'ADN de lignées cellulaires bien caractérisées
- Test de solutions d'une amorce spécifique par comparaison avec un panel d'ADN négatifs et d'ADN positifs
- Test d'un ensemble complet d'amorces spécifiques de séquences (SSP)
- Test du produit final

Etalon PCR interne positif

La couple d'amorces témoin[9] est incluse pour vérifier l'efficacité de la reaction PCR. Sa présence confirme que, s'il ne s'est pas produit d'amplification spécifique dans toute réaction donnée, cela est véritablement dû à l'absence de ce polymorphisme dans l'échantillon d'ADN, et non à un échec de l'amplification PCR.

En raison des différentes concentrations et des températures d'hybidation des couples d'amorces spécifiques, par comparaison au couple d'amorces étalon interne :

- L'intensité de la bande témoin diminue souvent en présence d'une amplification spécifique et
- Les amorces étalons internes sont plus sensibles aux conditions PCR non optimales et elles peuvent être utilisées pour contrôler l'efficacité de la PCR.

Une amplification non réussie des fragments de l'étalon interne dans un puit couloirs sans amplifications spécifiques doit être considérée comme un signe de performance sous-optimale du système. Se référer à la section « Tableau diagnostiqueur des anomalies» pour voir quelle pourrait en être la cause et savoir que faire pour y remédier.

Des informations spécifiques concernant l'Etalon interne positif sont données dans le Manuel d'Informations sur le Produit spécifiques du Lot fourni avec chaque kit.

MODE D'EMPLOI
Kits ***AllSet*$^{+}$™ et *CombiSet*$^{+}$™** SSP, par DYNAL
INTERPRETATION DES RESULTATS

Les allèles sont identifiés par la présence d'un produit PCR spécifique. Une amplification spécifique dans un puit indique que l'échantillon d'ADN contient l'allèle, ou un groupe d'allèles, défini par le couple d'amorces dans cette réaction de PCR. Le tableau d'interprétation fourni avec chaque lot peut servir à déterminer quel est l'allèle, ou le groupe d'allèles, que les solutions d'amorces respectives sont en mesure d'identifier.

Dans de nombreux Kits SSP *AllSet*$^{+}$™ ou *CombiSet*$^{+}$™ de Dynal, mais pas tous, chaque allèle ou groupe d'allèles est amplifié par plus d'une solution d'amorces. Il est important de vérifier que toutes les autres solutions d'amorces qui devraient être positives pour porter cet allèle ou groupe d'allèles sont, en fait, réellement positives.

Bien que les allèles soient attribués par la présence du produit PCR, les tailles relatives des produits PCR peuvent être utiles au niveau de l'interprétation des typages SSP.

Les tailles approximatives des produits PCR spécifiques peuvent être utilisées pour faire la distinction entre une vraie amplification positive et :

- artéfact de primer oligomère (primer dimers)
- un report provenant des cupules adjacentes
- des amplifications non spécifiques

Dans le tableau d'interprétation fourni avec chaque Kit *AllSet*$^{+}$™ et *CombiSet*$^{+}$™ SSP de Dynal, la séquence est donnée pour les trois nucléotides les plus terminaux, qui déterminent la spécificité à l'extrémité 3' de l'amorce avant ainsi que de l'amorce réverse.

- Pour les produits HLA Classe I, la position du nucléotide dans le 2ème, 3ème ou 4ème exon apparié à l'extrémité 3' des amorces est indiquée.
- Pour les Kits SSP *AllSet*$^{+}$™ HLA Classe II, la position du codon correspondant à l'extrémité 3' des amorces est indiquée.

Si la séquence d'un nouvel allèle ne figurant pas dans le tableau d'interprétation est disponible, les informations relatives à la séquence des amorces peut servir à trouver le modèle d'amplification du nouvel allèle. Dans un tel cas, se mettre en rapport avec les Services Techniques par courrier électronique hla@dynalbiotech.com ou bien par fax: +44 151 346 1223.

Interprétation en utilisant l'outil *SSPTool*™ de Dynal

L'outil *SSPTool*™ de Dynal est un logiciel qui a été spécialement conçu pour aider à interpréter les résultats. Chaque tableau d'interprétation spécifique de lot de kits *AllSet*$^{+}$™ et *CombiSet*$^{+}$™ SSP est entré dans la base de données du logiciel. Cette dernière est constamment mise à jour dès que de nouveaux lots de produits sont mis sur le marché.

Pour assistance et informations au sujet de la saisie des résultats et de l'utilisation du logiciel, consulter la section d'aide du *SSPTool*™.

Pour commander une copie gratuide du *SSPTool*™ de Dynal (référence produit : 990.80), veuillez contacter votre représentant local de Dynal Biotech.

MODE D'EMPLOI

Kits ***AllSet^{+}™ et CombiSet^{+}™*** SSP, par DYNAL

TABLEAU DIAGNOSTIQUEUR DES ANOMALIES/SOLUTIONS

PROBLEME	RAISON	SOLUTION
Aucune amplification (ni amplification des fragments de l'étalon interne, ni amplification spécifique) ne se produit	Quantité insuffisante d'ADN.	Vérifier que le volume et la concentration de l'ADN ajouté étaient corrects.
"	L'ADN contient des inhibiteurs de la PCR tels que des protéines ou de l'éthanol (provenant des étapes de la précipitation).	Mesurer la qualité de l'ADN. Suivre la méthode d'extraction de l'ADN du fabricant à la lettre. Essayer avec une autre méthode d'extraction de l'ADN. Réextraire l'ADN.
"	L'ADN a été extrait de sang hépariné.	Utiliser du sang non hépariné ou bien essayer le traitement à l'héparinase (voir Référence 8).
"	L'ADN est dissous dans un tampon contenant de l'EDTA.	Refaire l'extraction de l'ADN et dissoudre l'ADN dans de l'eau stérile.
Echec aléatoire de l'amplification	Si les capuchons des tubes pour PCR ne sont pas bien vissés, il y aura évaporation et l'amplification échouera.	S'assurer que tous les capuchons sont bien fermés. Utiliser un outil d'operculage.
"	Erreurs commises lors de la coulée du gel.	Vérifier que l'on a rempli un nombre suffisant de puits et qu'ils contiennent tous approximativement le même volume de mélange pour PCR.
"	Utilisation de pipettes non étalonnées.	Procéder à l'étalonnage systématique de toutes les pipettes conformément aux recommandations du fabricant.
"	Erreurs commises durant le pipetage.	Effectuer le pipetage en étant plus vigilant.
"	L'ADN échantillon, la polymérase Taq ou les pré-mélanges pour PCR n'ont pas été bien mélangés avant de les utiliser.	Mélanger brièvement en faisant tourbillonner avant d'utiliser.
Les fragments d'étalon interne sont faibles	ADN impur.	Mesurer la qualité de l'ADN. Répéter l'extraction de l'ADN avec des solutions fraîchement préparées.
"	Quantité insuffisante d'ADN	Mesurer la concentration de l'ADN et l'ajuster à 50 ng/µl.
"	La température d'hybridation est trop élevée, le thermalcycler n'est pas étalonné.	Etalonner le thermalcycler et vérifier le programme de PCR. Un thermalcycler utilisé pour PCR-SSP de routine doit être étalonné tous les 6 mois.
"	La quantité d'ADN-polymérase thermostable est insuffisante.	Utiliser une plus grande quantité d'enzyme dans les réactions PCR.
"	L'ADN-polymérase thermostable est de qualité médiocre.	Utiliser Amplitaq® , fabriqué par Perkin-Elmer.
Amplification non spécifique (échelles ou traînées)	ADN impur (Certains mélanges d'amorces ont une forte tendance à produire une amplification non spécifique – se référer aux notes de bas de page de chaque tableau de spécificité).	Tous les fragments de taille supérieure à celle du fragment de l'étalon interne peuvent être éliminés. Vérifier la qualité de l'ADN. Répéter l'extraction de l'ADN. L'absence d'ADN peut aussi causer des traînées.
Les signaux d'amplification deviennent de plus en plus faibles dans le temps	La solution de coloration du gel d'agarose au bromure d'éthidium est trop vieille.	Préparer une solution de bromure d'éthidium fraîche pour que le gel soit mieux coloré.
"	Une des lampes UV est cassée.	Vérifier l'équipement produisant la lumière UV.
Amplifications faussement négatives	La température d'hybridation est trop élevée, le thermalcycler n'est pas étalonné.	Etalonner le thermalcycler et vérifier le programme de PCR. Un thermalcycler utilisé pour la PCR-SSP de routine doit être étalonné tous les 6 mois.
Amplifications faussement positives	Pourrait découler d'une contamination.	Utiliser des gants, des embouts de pipette munis de bouchons filtrants et utiliser des zones séparées pour pré-PCR et post-PCR. Manipuler les échantillons avec précision à chaque étape. Vérifier l'absence de contamination en utilisant les amorces témoins de contamination de Dynal (référence produit : 990.05).
"	ADN impur.	Mesurer la qualité de l'ADN. Répéter l'extraction de l'ADN avec des solutions fraîchement préparées.
"	La température d'hybridation est trop élevée, le thermalcycler n'est pas étalonné.	Etalonner le thermalcycler et vérifier le programme d'PCR. Un thermalcycler utilisé pour la PCR-SSP de routine doit être étalonné tous les 6 mois.
Profils d'amplification bizarres	On n'utilise pas le tableau d'interprétation approprié.	Vérifier que le numéro du lot du produit utilisé correspond à celui du tableau d'interprétation utilisé.
"	Le profil d'amplification contient un 'faux positif'	Vérifier que toutes les amplifications spécifiques sont d'une taille correcte ou bien si un artéfact (report, dimère d'amorce) pourrait avoir été interprété à tort comme une amplification.
"	Nouvel allèle, qui n'est pas inclus dans le tableau d'interprétation.	Répéter le typage. Si le nouveau profil de l'amplification est reproductible, contacter le représentant local de Dynal Biotech pour lui demander des informations au sujet du profil d'amplificaiton des allèles récemment décrits.
Bandes non distinctes et brouillées	Il est possible que le tampon pour l'électrophorèse soit tiède.	Utiliser le tampon TBE recommandé. Faire le test avec une tension inférieure.
"	Le peigne utilisé a des fentes trop épaisses.	Utiliser des peignes plus fins (4 x 1 mm)
L'amplicon ne se charge pas comme il faut	Concentration différente entre le tampon de migration et le tampon de préparation du gel. Tampon de migration opérationnel incompatible avec l'amplicon PCR. Présence de bulles d'air dans la pipette	Utiliser le même tampon pour le gel et en tant que tampon de migration Le tampon TBE 0,5 est recommandé. Pipeter comme il faut.

1) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science. 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.

2) Wu, D. Y., Ugozzoli, L., Pal, B. K. & Wallace, R. B. (1989). Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. Proc Natl Acad Sci U S A 86(8), 2757-60.

3) Newton, C. R., Graham, A., Heptinstall, L. E., Powell, S. J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J. C. & Markham, A. F. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Res 17(7), 2503-16.

4) Olerup, O. & Zetterquist, H. (1992). HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation [see comments]. Tissue Antigens 39(5), 225-35.

5) Bunce, M., O'Neill, C. M., Barnardo, M. C. N. M., Krausa, P., Browning, M. J., Morris, P. J. & Welsh, K. I. (1995b). Phototyping: Comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilising sequence-specific primers (PCR-SSP). Tissue Antigens 46(5), 355-367.

6) Richmond, Y. ADN McKinney, W. (eds.) 1993. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.

7) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue. Tentative Guideline. NCCLS Document M29-T Villanova, PA:NCCLS, 1989.

8) Satsangi J, Jewell DP, Welsh K, Bunce M, Bell JI.Effect of heparin on polymerase chain reaction. Lancet. 1994 Jun 11;343(8911):1509-10.

9) Bein G, Glaser R, Kirchner H. Rapid HLA-DRB1 genotyping by nested PCR amplification. Tissue Antigens. 1992 Feb;39(2):68-73.

MODE D'EMPLOI
Kits ***AllSet*$^{+}$™ et *CombiSet*$^{+}$™** SSP, par DYNAL

GARANTIE

La garantie donnée au premier acheteur stipule que les produits ne sont conformes qu'à la quantité et au contenu indiqués sur le flacon et sur les étiquettes externes pour la durée de conservation indiquée. La responsabilité de Dynal Biotech et le recourt exclusif de l'acheteur, dans le cadre de cette garantie, se limite soit au remplacement, aux frais de Dynal Biotech, de tout produit présentant un défaut de fabrication, et qui sera renvoyé à Dynal Biotech, afranchissement prépayé, ou bien suivant le choix de Dynal Biotech, au remboursement jusqu'à concurrence du prix d'achat.

Les revendications pour des marchandises endommagées en cours de transport doivent être soumises au transporteur.

Cette garantie ne couvrira pas des produits ayant été modifiés par une société autre que Dynal Biotech, ou des produits ayant été mal utilisés ou manipulés. TOUTES LES AUTRES GARANTIES, EXPRESSES, TACITES OU STATUTAIRES, SONT SPECIFIQUEMENT EXCLUES PAR CE DOCUMENT, Y COMPRIS, ENTRE AUTRES, LES GARANTIES DE BONNE VALEUR MARCHANDE OU D'ADEQUATION POUR UN USAGE PARTICULIER. En toutes circonstances, la responsabilité maximale de Dynal Biotech se limite au prix des produits vendus par Dynal Biotech. EN AUCUN CAS DYNAL BIOTECH NE POURRA ETRE TENUE RESPONSIBLE POUR TOUT DEGAT SPECIAL, FORTUIT OU INDIRECT. Certains états n'acceptent pas que les garanties, ou que les remèdes pour violation de certaines transactions, aient des limites. Dans de tels états, il est possible que les limites détaillées ci-dessus ne soient pas pertinentes.

Ce produit ne peut être réemballé, reformulé ou revendu, sous quelle forme que ce soit, sans l'autorisation écrite de Dynal Biotech Ltd., Royaume-Uni.

MARQUES DE FABRIQUE UTILISEES DANS CE DOCUMENT/PRODUIT

Dynal® est une marque déposée de DYNAL BIOTECH A.S.A, Oslo, Norvège
AllSet™ et *AllSet*$^{+}$™ sont des marques de fabrique de DYNAL BIOTECH A.S.A, Oslo, Norvège
DynaMix™ est une marque de fabrique de DYNAL BIOTECH Ltd., Royaume-Uni
CombiSet™ et *CombiSet*$^{+}$™ sont des marques de fabrique de DYNAL BIOTECH., Royaume-Uni
SSPTool™ est une marque de fabrique de DYNAL BIOTECH A.S.A, Oslo, Norvège
AmpliTaq® est une marque déposée de Roche Molecular Systems, Inc. USA.
Electro-Fast® est une marque déposée de Advanced Biotechnologies Ltd (ABgene®)
GeneAmp® est une marque de fabrique de Roche Molecular Systems, Inc. USA

BREVETS UTILISES DANS CE DOCUMENT/PRODUIT

* Les produits SSP de Dynal sont vendus sous licence concédée par ZENECA Ltd. ARMS™ dans le cadre du Brevet Européen No. 0332435 et de la propriété de brevets internationaux correspondants. ARMS™ est une marque de fabrique de ZENECA Ltd.

** Ce produit est optimisé pour usage dans le Procédé d'amplification en chaîne par polymérase ("PCR"), qui est couvert par des brevets appartenant à Roche Molecular Systems Inc. et à F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"). Aucune licence relevant de ces brevets pour utiliser le procédé PCR n'est transmise expressément ou par implication à l'acheteur par l'achat de ce produit. Il est possible de se procurer d'autres informations sur les licences pour utiliser le Procédé PCR, aux Etats-Unis auprès du Directeur de la concession de licences de Roche Molecular Systems,, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, Californie, 94501, et hors des Etats-Unis, auprès du Directeur de la concession de licences pour PCR de F. Hoffman-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, DH-4070 Bâle, Suisse.

Fabriqué par Dynal Biotech Ltd., Royaume-Uni
Mis au point par Dynal Biotech Ltd., Royaume-Uni

MODE D'EMPLOI
Kits ***AllSet*$^{+}$™ et *CombiSet*$^{+}$™** SSP, par DYNAL

COORDONNEES

Dynal Biotech Ltd.,
11 Bassendale Road, Croft Business Park,
Bromborough, Wirral, CH62 3QL, Royaume-Uni
Tél: +44 151 346 1234, Fax: +44 151 346 1223
E-mail: hla@dynalbiotech.com, Internet: http://www.tissue-typing.com

Dynal Biotech A.S.A
PO Box 114 Smestad,
N-0309, Oslo, Norvège
Tél: +47 2206 1000
Fax: +47 22 50 70 15
E-mail:dynal@dynalbiotech.com
Internet: http://www.dynalbiotech.com

DYNAL BIOTECH GmbH
Bramfelder Chaussee 41
22177 Hambourg, Allemagne
Tél: +49 40 36 15 73-0
Fax: +49 40 36 15 73-30
E-mail: info@dynal.smartnet.de

Dynal Biotech Inc.
HLA Diagnostics Division
555 ADNorra Glen Court
Suite 5 Lafayette Hill, PA 19444, USA
Toll Free: +1 1866 DYNAL TT (396 2588)
Tél: +1 610 940 1511
Fax: +1 610 940 3606
E-mail: hla.us.cust.serv@dynalbiotech.com

Dynal Biotech S.A.
Centre de Transfert de l'U.T.C.,
66 Avenue de LADNshut
60200 Compiègne, France
Tél: +33 3 44 23 45 95
Fax: +33 3 44 23 16 14
E-mail:dynal.france@wanadoo.fr

Dynal Biotech Pty
PO Box 204, Carlton South,
Victoria 3053, Australia
Tel: 1 800 623 453
Tel: +61 3 9663 5777
Fax: +61 3 9663 6660
NZ Freecall: 0800 448 246
Email: techserv@dynal.com.au

Pour les informations relatives aux distributeurs de Dynal dans le monde, veuillez contacter Dynal Biotech Ltd

© Copyright 2003 Dynal Biotech Ltd., U.K. All rights reserved

Printed 12.03. Rev. 000